

Projekt 505.3000: Ontwikkeling en verbetering van onderzoekmethoden  
voor olien, vetten en oliezaden

Rapport: 87.50                      juli 1987

PROBLEMATIEK BIJ DE ANALYSE VAN  
STEROLEN MET BETULINOL ALS  
INTERNE STANDAARD

H.J. van der Kamp

Afdeling: Vetchemie

Goedgekeurd door: drs B.G. Muuse

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)  
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen  
Postbus 230, 6700 AE Wageningen  
Tel. 08370-19110  
Telex 75180 RIKIL

VERZENDLIJST:

INTERN:

directeur  
sectorhoofden  
afdeling KVC (4x)  
bibliotheek  
projectadministratie

EXTERN:

Agralin  
P.J. Wagstaffe - BCR Brussel  
Prof. dr ir. A. Huygebaert - RU Gent  
Directie VKA (Min. L & V)  
Drs H.J. Riphagen - Directie MOV (Min. L & V)  
Ir. R. Klomp - Directie VZ (Min. L & V)  
Drs C.H. Moen - Sectorhoofd Algemeen en Management, DLO  
Ir. N.W. Olieman - K. van W. Nijmegen  
Ir. J.A Jans / R.J. de Knegt - COZ  
Dr. J.P. Geerts / D. Fokkema - BKCF  
Ir. J. Wijsman - CIVO-TNO

## ABSTRACT

PROBLEMATIEK BIJ DE ANALYSE VAN STEROLEN MET BETULINOL ALS INTERNE  
STANDAARD

ANALYTICAL ASPECTS OF STEROL ANALYSIS WITH BETULIN AS INTERNAL  
STANDARD

Report nr 87.50                      July 1987

H.J. van der Kamp

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)  
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

3 tables, 5 annexes

International standardized sterol analyses are based on the isolation of the unsaponifiable matter, thin layer chromatography (TLC) clean up and gaschromatography (GC) of the silylated sterols. To express the results in mass percentages of the fat, an internal standard is used as is described in proposals of ISO, IDF and EC. International interlaboratory studies on this method show good repeatability; the reproducibility of the sterol composition is also good, but is very bad for the sterol content.

In this study an evaluation of the procedure has been made, step by step, to show critical points in the method.

For total saponification of the fat, 20 minutes are needed; the alkaline concentration was found to be not critical. One single extraction with diethylether was sufficient to extract the insaponifiable matter, including the internal standard. Betulin must be used as internal standard and added before the extraction. The best eluens for TLC is chloroform: diethylether: ammonia(33%)/90:10:0.5 (V:V:V). Silylation of the sterols and betulin is needed before GC analyses since betulin contains two hydroxyl groups. Only when TLC is not applied, e.g. by indicative or preliminar analysis, other internal standards like cholestane may be used. Then silylation is not necessary. In any case the calibration factor for the internal standard relative to (pure) cholesterol had to be determined. The other sterols are thought to have the same respons as cholesterol and need no further calibration.

When making use for these observations, it must be possible to obtain reproducible results of the sterol composition as well as the sterol content in the fat.

Keywords: sterol, determination, oil, fat, reproducibility,  
unsaponifiable matter

INHOUD:	Blz.
ABSTRACT	I
SAMENVATTING	III
1 INLEIDING	1
2 MATERIAAL EN METHODEN	2
2.1 Materiaal	2
2.2 Methoden	2
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	2
3.1 Verzeping	2
3.2 Extractie onverzeepbare bestanddelen	3
3.3 Keuze van interne standaard voor kwantificatie	4
3.4 Scheiding van de onverzeepbare bestanddelen met DLC	5
3.5 Silyleren van de sterolen	7
3.6 Gaschromatografie	8
3.7 Kalibratiefactoren bij gaschromatografie	8
4 CONCLUSIES	9
Bijlage I : Overzicht van de belangrijkste analysemethoden voor de sterolanalyse	
Bijlage II : Effectiviteit van de diethylether extractie	
Bijlage III: Effect van DLC voorscheiding	
Bijlage IV : Chromatogram van betulinol, onvolledig gesilyleerd	
Bijlage V : Chromatogrammen van de onverzeepbare bestanddelen van een mengsel van soja- en zonnebloemolie met daaraan toegevoegd squalaan, squaleen, cholestaan, cholesterol en betulinol	

## SAMENVATTING

De methode die internationaal het meest gebruikt wordt voor de bepaling van sterolen, berust op isolatie van de onverzeepbare bestanddelen waarna gaschromatografisch de sterolsamenstelling (onderlinge compositie) wordt bepaald na DLC en silyleren. ISO, IDF en EEG werken aan methoden waarbij de sterolen in % m/m op vetbasis bepaald worden. Hierbij wordt gebruik gemaakt van betulinol als interne standaard.

Uit internationale tussenlaboratoriumonderzoeken blijkt dat de sterolsamenstelling m.b.v. gaschromatografie nauwkeurig en reproduceerbaar vastgesteld kan worden. Ook het gehalte aan sterolen in massaprocenten op vetbasis is goed herhaalbaar te bepalen doch de reproduceerbaarheid is zeer slecht.

Dit rapport beschrijft stapsgewijs het onderzoek van de methode met interne standaard.

Uit het onderzoek blijkt dat een verzepingstijd van ten minste 20 minuten noodzakelijk is. De concentratie van de alcoholische loog is voor volledige verzeping van het vet minder kritisch. Eenmalig extraheren van de onverzeepbare bestanddelen en de interne standaard met diethylether bleek voldoende te zijn. De interne standaard moet worden toegevoegd voor de extraktie van de onverzeepbare bestanddelen; alleen betulinol komt hiervoor in aanmerking. Silyleren van de beide hydroxylgroepen in betulinol is noodzakelijk voor de GC analyse. Wanneer geen DLC voorscheiding wordt toegepast, b.v. bij indicatieve analyses, dan kan cholestaan als interne standaard worden gebruikt. Cholestaan hoeft niet gesilyleerd te worden voor GC analyse. De beste scheiding met DLC van de onverzeepbare bestanddelen wordt verkregen met het loopmiddel chloroform: diethylether: ammoniak 33% / 90:10:0.5 (V:V:V). De kalibratiefactor van de interne standaard moet altijd bepaald worden t.o.v. zuiver cholesterol. De respons van de fytosterolen wordt gelijk geacht aan cholesterol en wordt niet nader bepaald.

Wanneer rekening wordt gehouden met deze factoren moet het mogelijk zijn het sterolgehalte en de sterolsamenstelling goed reproduceerbaar te bepalen.



## 1 INLEIDING

De analyse van sterolen is in het olie- en vetonderzoek routine geworden sinds het begin van deze eeuw. Nog steeds vormt de analyse van de sterolen een van de fundamentele pijlers waarop de identificatie van olien en vetten berust. Echter vreemd genoeg is de analyse van de sterolen nog steeds onderhevig aan veranderingen. Bij de tot voor kort meest gangbare methode wordt het totaal sterolgehalte gravimetrisch bepaald door de sterolen na verzeping neer te slaan met digitonine. De sterolsamenstelling wordt vervolgens gaschromatografisch bepaald na het vrijmaken van de sterolen uit het digitonide (precipitaat van sterolen en digitonine). Nadeel van deze methode is dat de sterolen niet in gelijke mate neerslaan, waardoor geen betrouwbare sterolsamenstelling bepaald kan worden. Door het RIKILT is de methode jarenlang gebruikt voor de bepaling van bv. plantaardig vet in dierlijk vet, identificatie van de vetsoorten, bepaling van steroltracers in botervet. Deze methode wordt om bovengenoemde reden internationaal niet meer geaccepteerd. De huidige internationaal gebruikte methode is gebaseerd op isolatie van de onverzeepbare bestanddelen, een clean-up met dunne laag chromatografie en silyleren waarna gaschromatografisch de sterolsamenstelling (d.i. de onderlinge compositie van de sterolen getotaliseerd op 100 %) wordt bepaald. Nationaal en internationaal is echter sterk behoefte aan een methode waarbij de sterolen in massaprocenten van het vet worden berekend. Hiervoor is toevoeging van een interne standaard aan het vet nodig. Bij ISO, IDF en EEG is deze methode in voorbereiding. Uit enkele internationale tussenlabonderzoeken van o.a. IDF (Int. Dairy Federation) en BCR (Bureau Communautaire de Reference) gebaseerd op deze methode, blijkt dat de sterolsamenstelling nauwkeurig en reproduceerbaar vastgesteld kan worden, terwijl het gehalte aan sterolen in massaprocenten zeer slecht reproduceerbaar is. Stapsgewijs is deze methode met interne standaard onderzocht.

## 2 MATERIAAL EN METHODEN

### 2.1 Materiaal

Het onderzoek is uitgevoerd met een drietal monsters nl. RM 162 (mengsel soja- maisolie) van BCR en van IDF een monster botervet en een mengsel van botervet met kokosvet.

### 2.2 Methoden

In bijlage I wordt een overzicht gegeven van de belangrijkste methoden die zijn verschenen bij IUPAC, ISO, EEG, FIL-IDF en NEN die betrekking hebben op sterolanalysen.

De diverse stappen in de procedure van de methode die uitgaat van de analyse van de onverzeepbare bestanddelen zoals beschreven in de inleiding, worden in dit rapport successievelijk besproken.

## 3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

### 3.1 Verzeeping

Het doel van de verzeeping is tweeledig. In de eerste plaats worden de onverzeepbare bestanddelen geïsoleerd van de overmaat aan vetzuren cq. triglyceriden en worden de sterolen, voor zover ze veresterd zijn, gehydrolyseerd zodat ze samen met de vrije sterolen bepaald kunnen worden. Factoren die bij de verzeeping een rol spelen zijn de loogconcentratie en de verzeepingstijd. De invloed van deze twee parameters op de sterolgehalten is onderzocht. De resultaten staan opgenomen in tabel 1. De loogconcentratie blijkt geen verschil te geven op gehalten terwijl een verzeepingstijd van 5 minuten te kort lijkt. De meeste voorschriften gaan uit van een verzeepingstijd van ca. 45 minuten. In de praktijk gebruiken wij een verzeepingstijd van 20 minuten en verzeepingsreagens I. Gezien de resultaten zijn bij deze verzeeping geen noemenswaardige problemen te verwachten.

Tabel 1

Invloed van de loogsterkte en de tijd (min) van de verzeping op het gehalte aan sterolen in mg/100g vet in het soja-maismengsel (BCR)

Verzepingsreagens	I	I	I	II	II
Verzepingstijd	5	45	75	5	75
Campesterol	142	134	135	138	144
Stigmasterol	58	58	61	55	58
$\beta$ -Sitosterol	396	392	394	371	393
$\Delta^5$ Avenasterol	39	42	45	39	41

Verzepingsreagens I : 45 ml alcohol + 5 ml KOH 10N

II : 20 ml alcohol + 10 ml KOH 10N

### 3.2 Extractie onverzeepbare bestanddelen

Na de verzeping wordt water toegevoegd aan de alcoholische loogoplossing en de onverzeepbare bestanddelen worden geextraheerd met diethylether (drie keer). Uit een experiment met de standaarden cholestaan, cholesterol en betulinol blijkt dat een eenmalige extractie met diethylether al meer dan 99 % recovery van deze stoffen geeft. Dit is getest door aan de drie etherextracten steeds eenzelfde hoeveelheid squalaan toe te voegen en afzonderlijk verder op te werken. In het chromatogram van het tweede etherextract werden nog slechts sporen cholestaan, cholesterol en betulinol gevonden (chromatogrammen zijn opgenomen in bijlage II). Normaliter extraheren wij een maal. Bij voorschriften die petroleum ether i.p.v. diethylether gebruiken (zoals EEG methode voor olijfolie) moet rekening gehouden worden met een veel geringere extractiecapaciteit.



### 3.3 Keuze van interne standaard voor kwantificatie

De meest gebruikte interne standaarden zijn cholestaan en betulinol. De interne standaard wordt toegevoegd om het gehalte aan sterolen op vetbasis te kunnen berekenen. De keuze van de interne standaard is internationaal nog in discussie en is nog niet opgenomen in een definitieve methode. In het verleden werd de interne standaard toegevoegd na extractie van de onverzeepbare bestanddelen en dunne laag chromatografie. Verliezen tijdens die voorafgaande bewerkingen leidden dan tot grote fouten in het gehalte op vetbasis. Daarentegen was de gaschromatografisch gevonden sterolsamenstelling wel goed reproduceerbaar. Het is derhalve noodzakelijk om een interne standaard te gebruiken die aan het begin van de bepaling wordt toegevoegd. Cholestaan kan niet worden gebruikt wanneer een DLC clean-up wordt toegepast omdat cholestaan niet in de sterolenband terecht komt. Betulinol komt wel in de sterolenband terecht maar moet gesilyleerd worden vanwege de vrije hydroxylgroepen (zie 3.2.5).

Om de bruikbaarheid van enkele interne standaarden te toetsen, is aan het soja- maismengsel van BCR zowel cholesterol, betulinol als cholestaan toegevoegd als interne standaard. Vervolgens zijn de gehalten van de diverse sterolen bepaald door de onverzeepbare bestanddelen te isoleren volgens NEN 6328 zonder drogen van de onverzeepbare bestanddelen, gevolgd door silyleren en rechtstreekse GCC analyse van de onverzeepbare bestanddelen (dus geen DLC).

Kalibratiefactoren van cholestaan en betulinol t.o.v. cholesterol zijn met standaardmengsels bepaald. In tabel 2 staan de sterolgehalten gevonden via de verschillende interne standaarden.

Tabel 2

Gevonden sterolgehalten in mg/100g vet in het soja-maismengsel (BCR) (gemiddelde van vier analyses) berekend op de interne standaarden cholestaan, cholesterol en betulinol

	Cholestaan	Cholesterol*	Betulinol
Campesterol	137	132	139
Stigmasterol	58	57	60
$\beta$ -sitosterol	392	385	399
$\Delta^5$ avenasterol	42	41	43

\* De waarden gevonden met cholesterol kunnen iets te laag zijn omdat niet gecorrigeerd is voor cholesterol uit het monster zelf

Uit deze tabel kan afgeleid worden dat cholestaan, cholesterol en betulinol zich bij de bepaling gelijk gedragen, hetgeen inhoudt dat bv. geen ontleding van betulinol optreedt bij de verzeeping en er geen discriminatie is bij de extractie van de onverzeepbare bestanddelen.

#### 3.4 Scheiding van de onverzeepbare bestanddelen met DLC

DLC wordt gebruikt om de sterolen te isoleren van andere onverzeepbare bestanddelen zoals tocoferolen, triterpenen, carotenen, minerale olien, enz. De onverzeepbare bestanddelen worden op een dunne laag plaat met silicagel gebracht en geelueerd. Als interne standaard kan alleen betulinol gebruikt worden omdat betulinol in of in de nabijheid van de sterolenband komt, dit in tegenstelling tot cholestaan. In schema 1 zijn de scheidingen weergegeven die verkregen worden met vier verschillende loopmiddelen. Deze worden gebruikt door RIKILT, NEN, IDF resp. CIVO-TNO. De platen zijn na deze ontwikkeling bespoten met een 1% dichloorfluoresceïn-oplossing in methanol en bekeken onder UV licht bij 366 nm.

Schema 1

RIKILT		NEN		IDF	CIVO	
Hexaan	60	Hexaan	75	Chloroform	Chloroform	90
DEE	40	DEE	25		DEE	10
Mierenzuur	1				Ammoniak 33%	0.5
blauw				blauw	blauw	
		???				
blauw						
					sterolen	
geel					betulinol	
		geel				
sterolen		sterolen		sterolen		
betulinol		betulinol		geel+betul.		
					--geel--	basis

De loopmiddelen bestaande uit hexaan : diethylether : mierenzuur / 60:40:1 of chloroform : diethylether : ammoniak 33% / 90:10:0.5 geven de beste scheidingen waarbij met name een geel gekleurde band buiten de sterolenband blijft en betulinol nagenoeg samenvalt met de sterolen zodat deze als een band kunnen worden afgekrabd.

De invloed van DLC is onderzocht aan de hand van de drie monsters. De resultaten staan in tabel 3, de chromatogrammen van de GCC analyse met en zonder DLC clean-up van het soja- maismengsel waaraan cholestaan, cholesterol en betulinol is toegevoegd, zijn opgenomen in bijlage III.

Tabel 3

Sterolgehalten in mg/100g vet zonder en met DLC voorscheiding gevonden in soja/maismengsel (BCR), botervet en botervet/kokosvetmengsel (IDF) met betulínol als interne standaard

Monster DLC	soja/mais		botervet		botervet/kokos	
	zonder	met	zonder	met	zonder	met
Cholesterol			291	280	276	272
Campesterol	137	136				
Stigmasterol	59	62				
$\beta$ -sitosterol	394	399	1	1	4	3
$\Delta 5$ avenasterol	42	41				

Uit de tabel blijkt dat er zonder en met DLC vrijwel geen verschillen in sterolgehalten worden gevonden. Wanneer geen DLC clean-up wordt toegepast, dan kunnen cholesterol en  $\alpha$ -tocoferol samenvallen (zeker bij gepakte kolommen), terwijl in de chromatogrammen (bijlage III), ook niet-sterolcomponenten voorkomen. Deze componenten kunnen in sommige gevallen de sterolsamenstelling storen. Als capillaire gaschromatografie wordt toegepast dan is de scheiding echter zodanig dat DLC meestal niet nodig is.

### 3.5 Silyleren van de sterolen

Silyleren van de vrije hydroxyl-groep van de sterolen is onder optimale GC condities niet noodzakelijk. Wanneer bij de GC analyse echter tailing optreedt doordat de kolom actieve plaatsen vertoont, dan kan silyleren dit probleem (tijdelijk) ondervangen. Een veel dwingender reden om te silyleren is het gebruik van betulínol als interne standaard. Betulínol bevat twee vrije hydroxyl groepen en zal zonder silyleren een veel te grote retentietijd hebben met bovendien een slechte piekvorm. De silylering van betulínol verloopt in tegenstelling tot de sterolen moeilijk. Als silyleringsreagens wordt



in de meeste gevallen MSTFA gebruikt. Onderzoek heeft uitgewezen dat betulinol volledig gesilyleerd wordt bij 120°C in 30 min. Wanneer de silyleringstijd te kort wordt genomen of de temperatuur te laag is, wordt betulinol onvolledig gesilyleerd en kunnen in het chromatogram vier pieken ontstaan (zie chromatogram in bijlage IV) zodat hiermee steeds controle op volledige silylering mogelijk is.

### 3.6 Gaschromatografie

Sterolen worden geanalyseerd op apolaire vloeibare fasen in capillaire of gepakte kolommen. Door het RIKILT worden uitsluitend fused silica capillaire kolommen gebruikt. De resultaten die hiermee verkregen worden, zijn vergelijkbaar met de resultaten van gepakte kolommen. Wel moet in enkele gevallen een aantal pieken bij elkaar worden geteld omdat met capillaire kolommen betere scheidingen worden verkregen. In bijlage V zijn chromatogrammen, analyseomstandigheden en relatieve retentietijden opgenomen van de verschillende sterolen, tocoferolen en interne standaarden al dan niet gesilyleerd.

### 3.7 Kalibratiefactoren bij gaschromatografie

Voor het bepalen van het gehalte aan sterolen wordt gebruikt gemaakt van een interne standaard. Vaak wordt ten onrechte aangenomen dat de interne standaard dezelfde respons in de FID detector heeft als sterolen en worden geen kalibratiefactoren bepaald. Met onzuiverheden in de interne standaard en massagevoelige stappen (FID respons, discriminatie bij injectie) bij de gaschromatografische analyse wordt dan echter geen rekening gehouden. Het is dus noodzakelijk de kalibratiefactor van de interne standaard te bepalen relatief t.o.v. (zuiver) cholesterol.

Voor de andere sterolen wordt aangenomen dat ze bij de GCC analyse dezelfde respons hebben als cholesterol.

#### 4 CONCLUSIES

Uit het onderzoek blijkt dat:

- de loogconcentratie tijdens de verzeping niet kritisch is en een verzepingstijd van minimaal 20 minuten moet worden aangehouden;
- 1 keer extraheren van de onverzeepbare bestanddelen met diethylether reeds voldoende is;
- de interne standaard voor de extractie van de onverzeepbare bestanddelen moet worden toegevoegd;
- wanneer een DLC voorscheiding van de onverzeepbare bestanddelen wordt toegepast, cholestaan niet te gebruiken is als interne standaard. Betulinol moet dan worden gekozen. Het beste loopmiddel voor DLC is een mengsel van chloroform : diethylether : ammoniak 33% / 90:10:0.5;
- silyleren noodzakelijk is als betulinol als interne standaard wordt gebruikt;
- bij gebruik van capillaire gaschromatografie een DLC voorscheiding van de onverzeepbare bestanddelen niet altijd noodzakelijk is. Cholestaan kan dan als interne standaard gebruikt worden met als voordeel dat silyleren achterwege kan blijven;
- de kalibratiefactor van de interne standaard altijd bepaald worden t.o.v. zuiver cholesterol.

Wanneer rekening wordt gehouden met het bovengestelde, moet het mogelijk zijn goed reproduceerbaar het sterolgehalte en de sterolsamenstelling te bepalen.

Bijlage I: Overzicht van de belangrijkste analysemethoden voor de sterolanalyse.

NEN 6328 Bepaling van het gehalte aan onverzeepbare bestanddelen.

NEN 6350 Bepaling van het totaal sterolgehalte.

NEN 6364 Afscheiding van de sterolen uit de onverzeepbare bestanddelen door middel van dunnelaagchromatografie.

NEN 6365 Bepaling van de sterolsamenstelling door middel van gaschromatografie.

ISO 3594 Milk fat- Detection of vegetable fat by gas-liquid chromatography of sterols (reference method)

ISO 3595 Milk fat- Detection of vegetable fat by the phytosterylacetate test.

ISO 6799 Animal and vegetable fats and oils- Determination of composition of the sterol fraction - method by gas-liquid chromatography.

FIL-IDF 32:1965 Detection of vegetable fat in milk fat by the phytosterylacetate test.

FIL-IDF 54:1970 Detection of vegetable fat in milk fat by gas-liquid chromatography.

IUPAC 2.401 Determination of the unsaponifiable matter.

IUPAC 2.402 Qualitative examination and determination of the total sterols by their digitonides.

IUPAC 2.403 Identification and determination of sterols by gas-liquid chromatography.

IUPAC 2.404 Determination of total sterol in oil and fats.  
(enzymatisch)

EEG verordening nr. 1058/77 betreffende kenmerken van olijfolie  
Bijlage VIII.

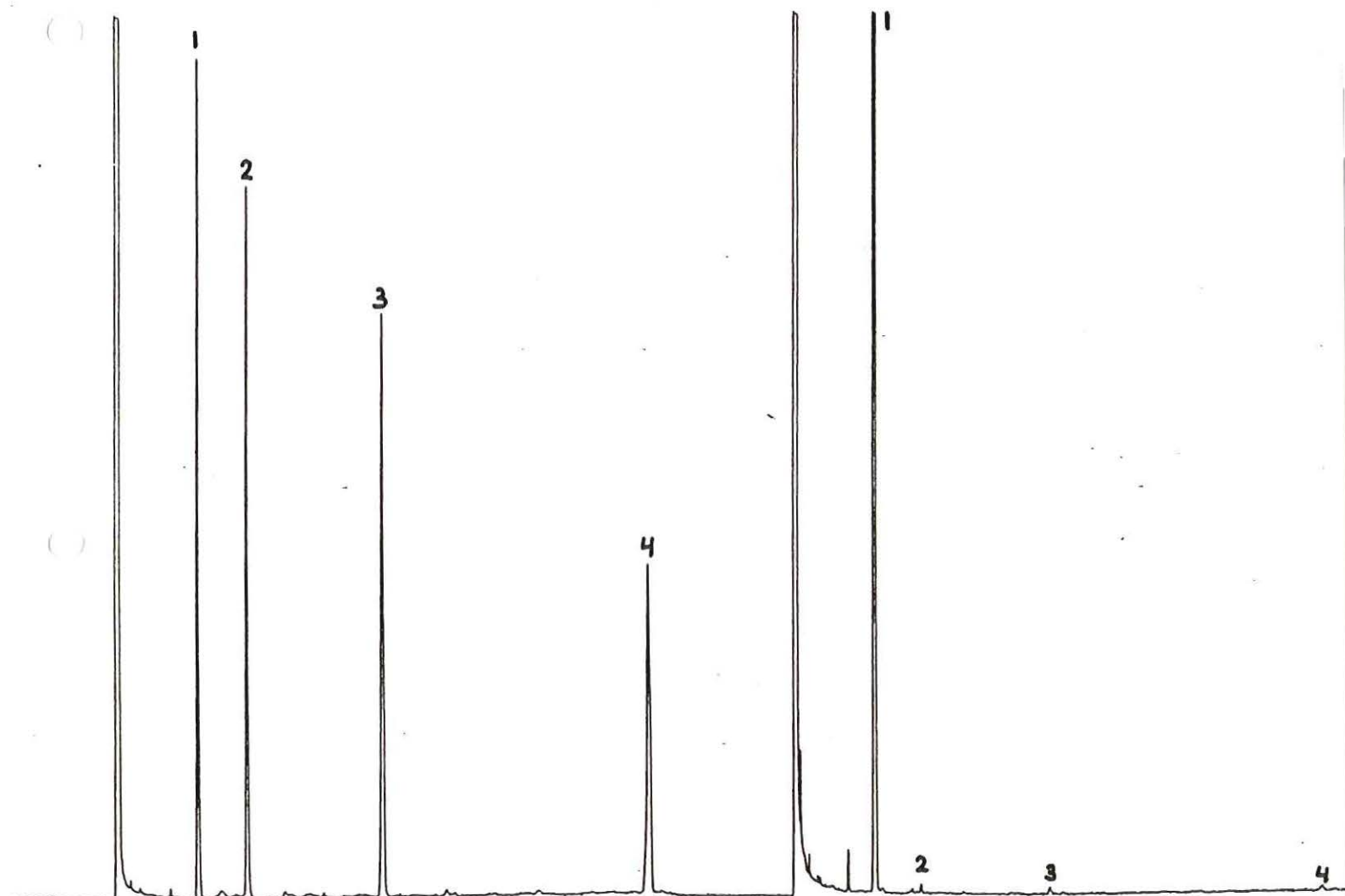
EEG ontwerpmethode Determination of sterols in butteroil.  
Werkdocument VI/4275/87

# EFFECTIVITEIT VAN DE DIETHYLETHER EXTRACTIE

Chromatogrammen van de standaarden na 1 x en 2 x extraheren (zie hfdst. 3.2.2). Squalaan is na de extractie toegevoegd als interne standaard.

1e extractie

2e extractie

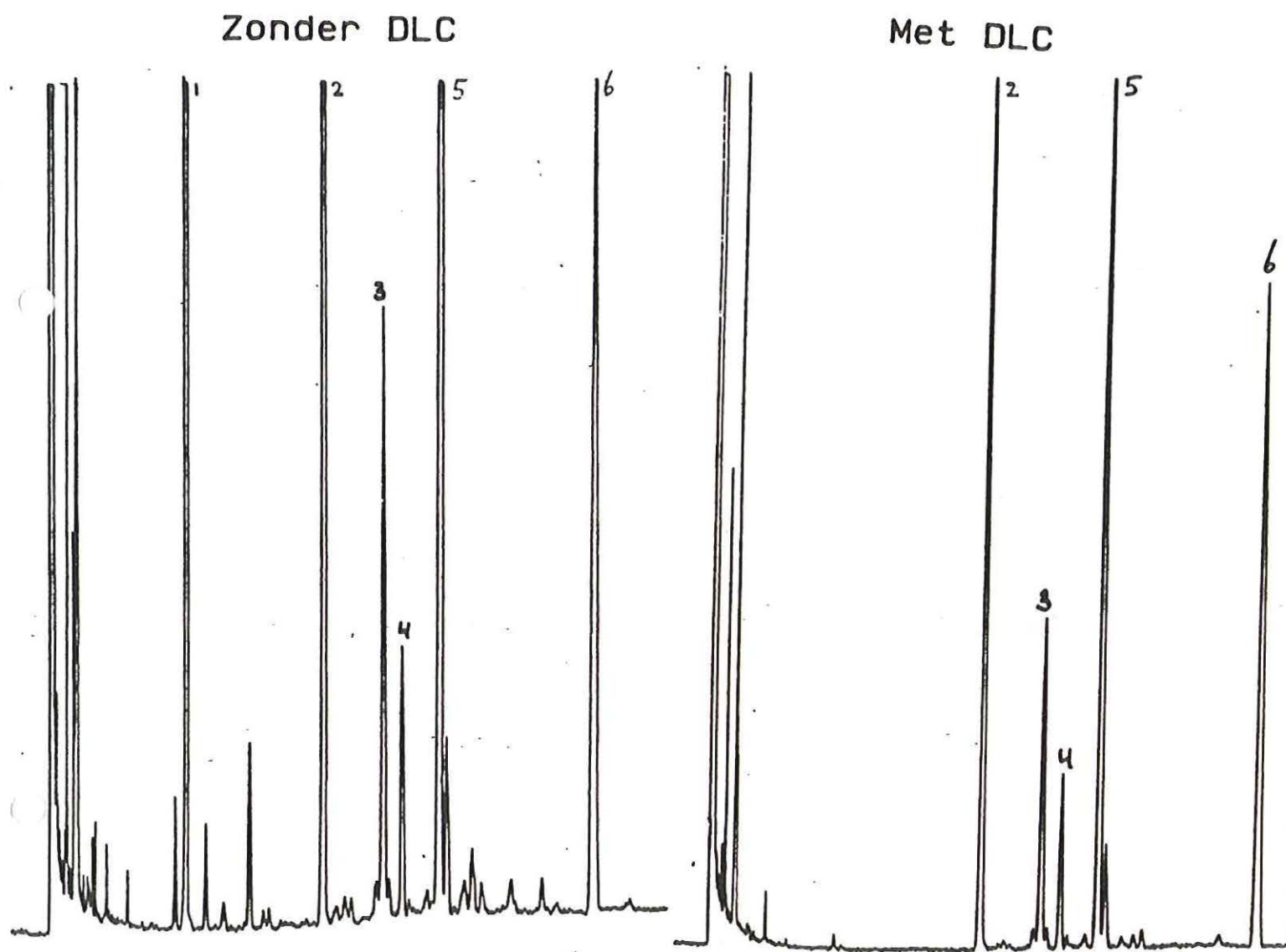


- 1 Squalaan
- 2 Cholestaan
- 3 Cholesterol
- 4 Betulinol



## EFFECT VAN DLC VOORSCHIEDING

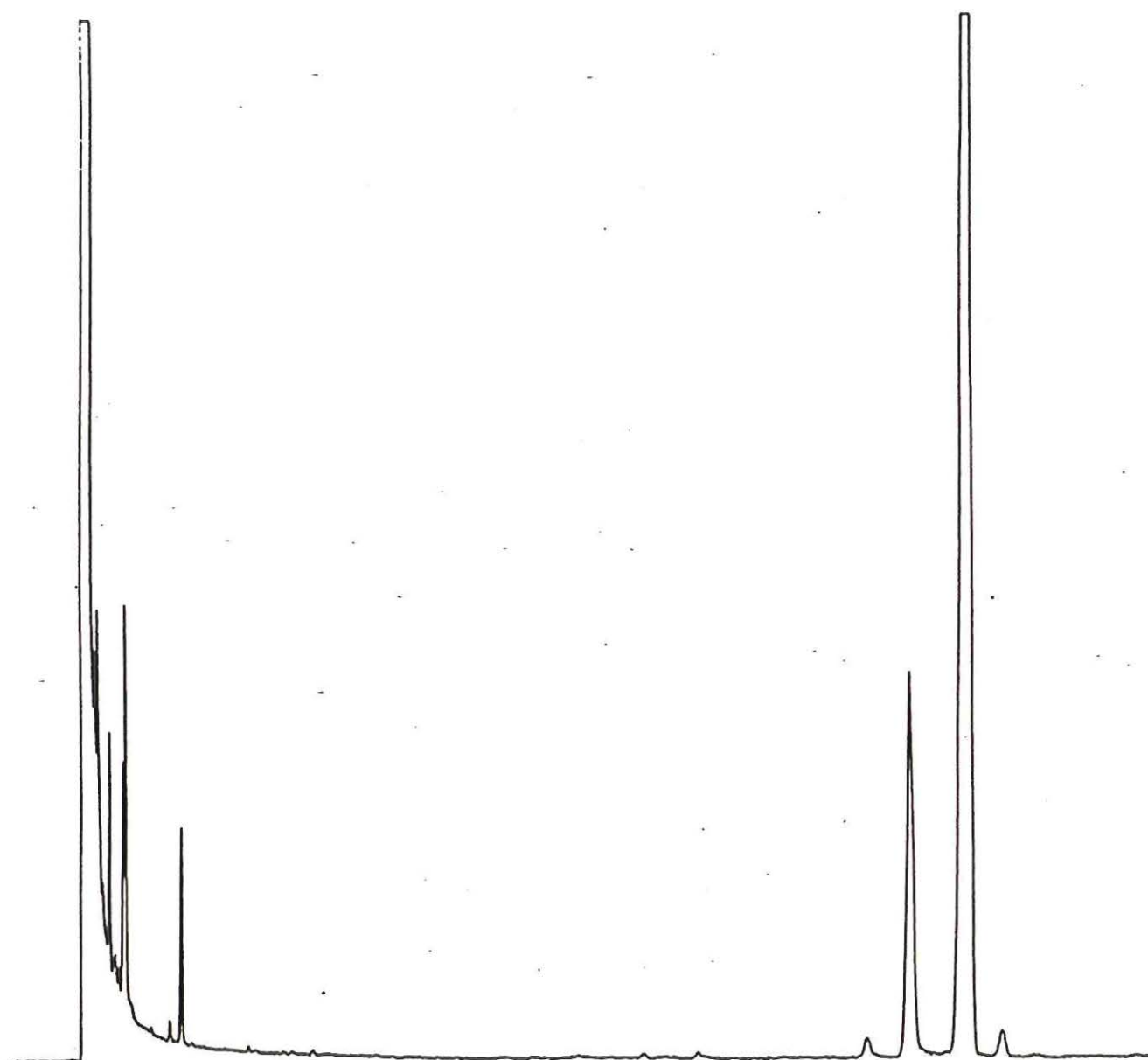
Chromatogrammen van de onverzeepbare bestanddelen  
(zie hfdst. 3.2.4).



## Identificatie

- 1 Cholestaan
- 2 Cholesterol
- 3 Campesterol
- 4 Stigmasterol
- 5  $\beta$ -Sitosterol
- 6 Betulinol

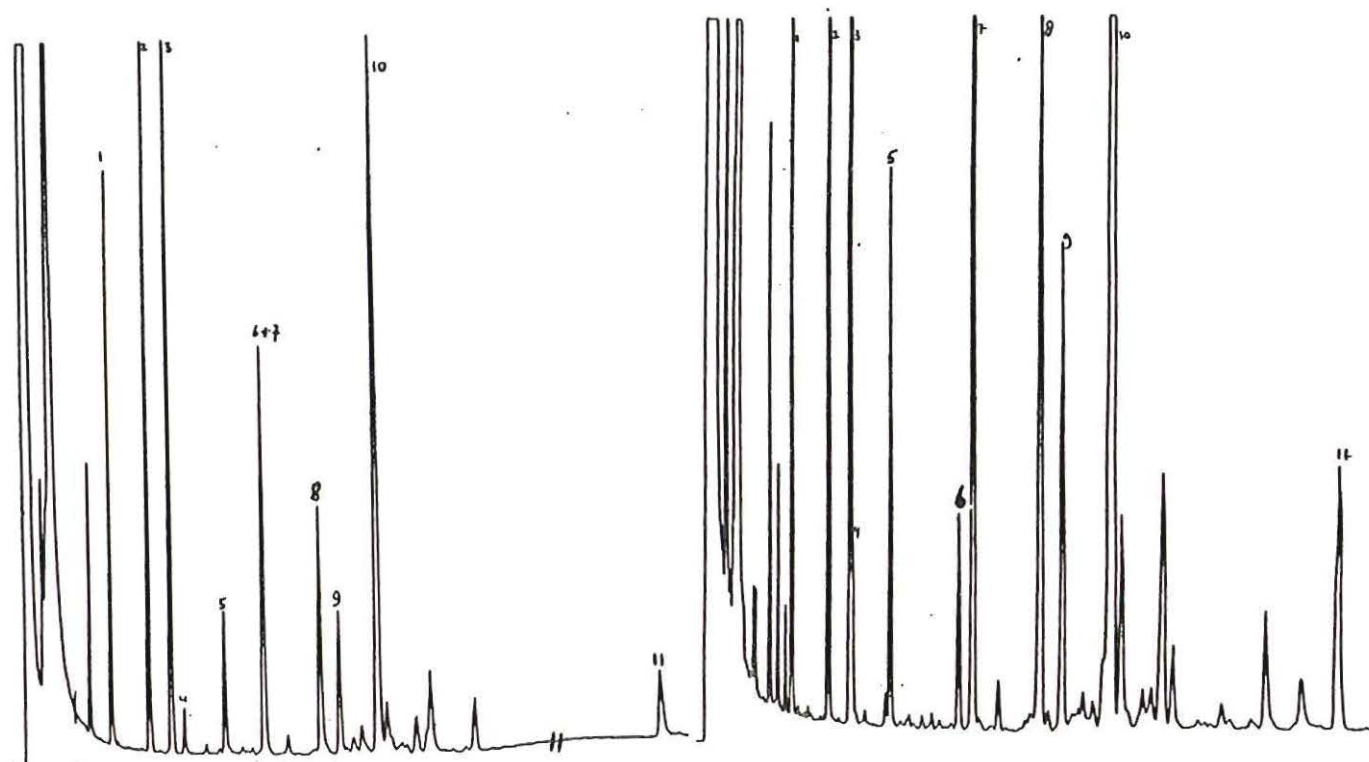
CHROMATOGRAM VAN BETULINOL, ONVOLLEDIG GESILYLEERD



Chromatogrammen van de onverzeepbare bestanddelen van een mengsel van soja- en zonnebloemolie met daaraan toegevoegd squalaan, squaleen, cholestaan, cholesterol en betulinol.

Ongesilyleerd

Gesilyleerd



Comp.nr	Component	Ongesilyleerd RRT	Gesilyleerd RRT	
1	Squalaan	0.34	0.34	(0.31) *
2	Squaleen	0.51	0.51	(0.46)
3	Cholestaan	0.61	0.61	(0.54)
4	$\delta$ Tocoferol	0.68	0.61	(0.55)
5	$\beta + \gamma$ Tocoferol	0.84	0.78	(0.70)
6	$\alpha$ Tocoferol	1	1.06	(0.85)
7	Cholesterol	1	1.18	(1)
8	Campesterol	1.25	1.39	(1.20)
9	Stigmasterol	1.33	1.48	(1.33)
10	$\beta$ -Sitosterol	1.56	1.68	(1.50)
11	Betulinol	?	2.64	(2.36)

\* RRT ten opzichte van de TMS ether van Cholesterol.

Analyseomstandigheden:

Kolom : Cp Sil 5 CB, 25 m x 0.22mm ID  
 Temperatuur : 280°C  
 Detector : FID  
 Draaggas : Helium, 1.1 bar  
 Injectie : Gesplit, 1:100